

COULOMETRICKÉ STANOVENÍ ASKORBOVÉ KYSELINY V POTRAVINÁCH

Úvod

L-askorbová kyselina neboli vitamín C je látkou nezbytnou pro život a zdraví člověka. Je důležitá pro metabolismus aminokyselin a syntézu kolagenu, pro tkáňové dýchání, podporuje vstřebávání železa, stimuluje tvorbu bílých krvinek, vývoj kostí, zubů a chrupavek. Podporuje růst a je nezbytná k hojení ran. Podílí se také na odbourávání cholesterolu v játrech a na antioxidační obraně buňky, ačkoliv za určitých podmínek může působit naopak prooxidačně.

Člověk na rozdíl od většiny ostatních savců nedokáže tuto látku ve svém organismu syntetizovat a musí ji získávat z potravy. Doporučená denní dávka je 60 mg (podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin). Bohatým zdrojem vitamínu C je ovoce (např. citrusové plody, černý rybíz, jahody, kiwi), zelenina (zejm. tmavá listová a košťálová, dále papriky, rajčata, česnek), brambory, luštěniny, šípky atd. Obsah askorbové kyseliny se snižuje při stárnutí potravin, jejich tepelné úpravě či jiném zpracování, např. sušení.

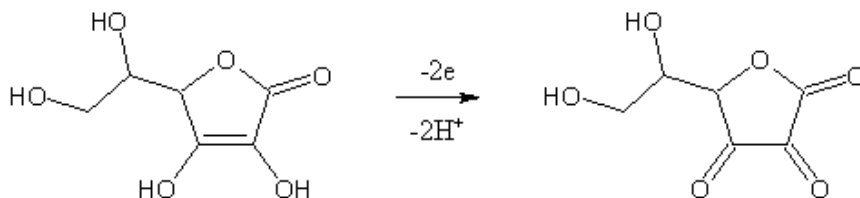
Pro stanovení askorbové kyseliny v potravinách se používají zejména titrační metody (redoxní titrace s 2,6-dichlorfenolindofenolem nebo jodem) a HPLC. Vhodnou metodou je také přímá coulometrická titrace v porézní uhlíkové elektrodě (průtoková chronopotenciometrie).

Úkol

Průtokovou coulometrickou titrací s porézní uhlíkovou elektrodou stanovte obsah askorbové kyseliny v kontrolním vzorku, ochucené stolní vodě a ve vzorcích ovoce a zeleniny, které si přinesete k analýze.

Princip

Porézní uhlíková pracovní elektroda se naplní roztokem vzorku a přítomná askorbová kyselina se konstantním proudem oxiduje na dehydroaskorbovou kyselinu:



Průběh oxidace se sleduje měřením potenciálu pracovní elektrody (chronopotenciometrie). Během oxidace se potenciál mění pomalu, po úplném zoxidování askorbové kyseliny dochází k jeho skokové změně, což indikuje konec titrace. Získaný signál $dt/dE = f(t)$ má tvar píku, jehož plocha odpovídá přechodovému času τ úměrnému koncentraci analytu ve vzorku.

Koncentrace analytu je definována pomocí Faradayova zákona:

$$\delta = \frac{I \tau M}{R z F V}$$

δ hmotnostní koncentrace analytu (g/dm^3)

I konstantní elektrolytický proud (A)

τ přechodový čas (s)

R proudový (elektrolytický) výtěžek

z počet elektronů účastnících se elektrodové reakce

F Faradayova konstanta (96 484,56 C/mol)

V dávkovaný objem vzorku (dm^3)

M molární hmotnost analytu ($M_{\text{askorbová kys.}} = 176,12 \text{ g/mol}$)

Protože hodnota R se může měnit v závislosti na experimentálních podmínkách, provádí se stanovení kalibrační metodou.

Askorbová kyselina je nestabilní, velmi snadno se oxiduje vzdušným kyslíkem, zvláště za zvýšené teploty. Její rozklad je také katalyzován některými kovy, zejména ionty Cu^{2+} a Fe^{3+} . Ke stabilizaci askorbové kyseliny se používají kyselé prostředí, komplexotvorná a redukční činidla (např. šťavelová kyselina, kyselina metafosforečná, EDTA, siřičitan sodný apod.).

Zařízení

Počítačem řízený elektrochemický analyzátor EcaFlow 120 GLP s kompaktní průtokovou měřicí celou s pracovní porézni uhlíkovou elektrodou E56C (vše Istran, Bratislava)

Chemikálie a pomůcky

Pevný NaCl, kyselina šťavelová (p.a.), Triton
Roztok kyseliny askorbové o koncentraci 10 g/l
Tyčový mixér a kádinka na mixování vzorku ovoce nebo zeleniny
Filtrační kruh, nálevka, stojan, 100 ml odměrná baňka, vata
Injekční stříkačka (20 ml) a stříkačkové filtry nylonové nebo PES (0,45 μm), zkumavka

Pracovní postupy

Příprava základního elektrolytu

Do litrové odměrné baňky odvažte 1 g kyseliny šťavelové, vypočítané množství NaCl, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,1 mol/l. Rozpusťte v destilované vodě, přidejte 1 ml Tritonu a doplňte destilovanou vodou po rysku.

Příprava kalibračního roztoku askorbové kyseliny

Kalibrační roztok askorbové kyseliny připravte v koncentraci 20 mg/l: do 100 ml odměrné baňky odměřte vypočítané množství zásobního roztoku askorbové kyseliny (10 g/l) a doplňte po značku základním elektrolytem.

Příprava kontrolního vzorku

Předložený kontrolní vzorek v 50 ml odměrné baňce doplňte po rysku roztokem **základního elektrolytu**.

Příprava vzorku ochucené stolní vody

Do 50 ml odměrné baňky odměřte 20 ml stolní vody a doplňte po rysku **základním elektrolytem**.

Příprava vzorků ovoce a zeleniny

Asi 1-10 g čerstvého nebo 1-2 g sušeného rostlinného materiálu (podle očekávaného obsahu askorbové kyseliny) zvažte s analytickou přesností v kádince o vhodné velikosti (pro tyčový mixér). Přidejte 50 ml základního elektrolytu a rozmixujte tyčovým mixérem. Pomocí základního elektrolytu homogenizát kvantitativně převedte do 100 ml odměrné baňky a doplňte elektrolytem po rysku. Bezprostředně před analýzou zfiltrujte vzorek přes vatu a 10-15 ml filtrátu přefiltrujte přes stříkačkový mikrofiltr do připravené zkumavky.

Postup měření

1. Zapněte přístroj EcaFlow síťovým vypínačem na zadním panelu. Přítlačné ramínko čerpadla uveďte do pracovní polohy, před měrnou celou zapojte stříkačkový filtr. Zkontrolujte, že jsou přívodní hadičky přístroje ponořeny v destilované vodě.
2. Zapněte počítač a spusťte program **EcaFlow Autosampler**.
3. Stiskněte tlačítko **Naplnění**. Průtokový systém se naplní vodou.
4. Stiskněte tlačítko **Nastavení parametrů (S)**, zvolte metodu č. 36 a potvrďte klávesou OK nebo ENTER. Zkontrolujte nastavené parametry v záložce **Všeobecné**:

Kalibrácia <input type="radio"/> Bezkalibračne <input checked="" type="radio"/> Kalibračná priamka <input type="radio"/> Prídavok štandardu	Nahromadenie <input type="radio"/> GST <input checked="" type="radio"/> PST	Meranie pozadia <input type="radio"/> Iba pred prvým meraním <input type="radio"/> Pred každým meraním <input checked="" type="radio"/> S každou novou vzorkou alebo štandardom <input type="radio"/> S každou 0 . vzorkou alebo štandardom
Typ kalibracnej krivky <input checked="" type="radio"/> Priamka <input type="radio"/> Polynom 2.stupna	Autosampler <input checked="" type="radio"/> Vyp. <input type="radio"/> Zap.	

5. Zjistěte průtokovou rychlost: výtokovou hadičku vyjměte z odpadní nádoby pod pracovním stolem a vložte do předem zvážené prázdné kádinky. Aktivujte okénko **Pump** a 5 min jímejte vodu z přístroje do kádinky. Z přírůstku hmotnosti kádinky určete objemový průtok v ml/min a jeho hodnotu zadejte do parametrů **Měření**:

Nahromadenie Edepos : 0 mV Idepos : 0 uA	Pauza (s) Quiesc1 : 5 Quiesc2 : 0 Regen : 5	Objem (ml) Vzorka : 3 Pozadie : 3 Preplach : 0
Potenciál (mV) Estart1 : 0 Estart2 : 0 Estop : 800 Eregen : 0 Estndby : 0	Rozpúšťanie : Istrip : 100 uA Max. čas : 600 s Pumpa : <input checked="" type="radio"/> Vyp <input type="radio"/> Zap.	Segmentovať vzorku <input checked="" type="radio"/> Nie <input type="radio"/> Áno
Merací mód <input checked="" type="radio"/> Mód A <input type="radio"/> Mód B		
Prietok : ml/min		

6. Dále v **Nastavení parametrů (S)**, záložce **Kalibrace** zadejte koncentraci kalibračního roztoku (Cstd1):

AA	mg/l
Kalibračná priamka	Prídavky štandardu
Cstd1 : 20 mg/l	Cstd : 10000 mg/l
Cstd2 : 0 mg/l	1. prídavok : 0.1 ml
Cstd3 : 0 mg/l	2. prídavok : 0 ml
	3. prídavok : 0 ml

7. V záložce **Vzorky** po stisknutí tlačítka **Přidat** definujte názvy všech vzorků a počet opakování měření. Okénko **Analyzuj** aktivujte pouze u toho vzorku, který se chystáte měřit, např.:

Nád...	Kód vzorky	Analyzuj	Hmotnosť vzork...	Rozpustené d...	Zriedené...	do konečného o...	Opak...
✓ 1	kontrolní vzorek	Áno	0.00	0.00	1.00	1.00	3
• 2	stolní voda	Nie	0.00	0.00	1.00	1.00	3
• 3	salát	Nie	0.00	0.00	1.00	1.00	3

Přidat Upravit Zmazať

Nádoba vzorky: 50 ml

8. Soubor uložte do adresáře **PAC** pod názvem, který bude obsahovat vaše jméno a datum měření.
 9. **Modrou** a **červenou** hadičku ponořte do roztoku základního elektrolytu, **žlutou** hadičku ponořte do kalibračního roztoku (20 mg/l).
 10. Tlačítkem **Start** (!) spusťte měření. Ve spouštěcím okně zadejte **3** opakování měření standardu, svoje jméno a stiskněte Start:

Step

Krok 1 : Štandard

Krok 2 : Vzorky

Počet meraní : 3

Zmazať predošlé signály

Meno obsluhy : Jméno Příjmení

Nastavenie

Štart

Storno

11. Po změření kalibračního roztoku integrujte získaný pík v mezích nastavených kurzorem tak, aby červená základní linie tvořila tečnu k oběma patám píku. Soubor uložte.
 12. Žlutou přívodní hadičku vyjměte z roztoku standardu a vložte do vzorku. Spusťte měření tlačítkem **Start** (!). Zkontrolujte, že je aktivní **Krok 2**:

Step

Krok 1 : Štandard

Krok 2 : Vzorky

Počet meraní : 3

Zmazať predošlé signály

Meno obsluhy : klm

Nastavenie

Štart

Storno

13. Přístroj provede analýzu zvoleného vzorku. Ukončení měření ohlásí zvukovým signálem.
 14. Naměřený signál integrujte. Výsledky zobrazte pomocí tlačítka **Ukaž výsledky** (📄). Hodnoty si opište do laboratorního deníku. Soubor znovu uložte.
 15. Žlutou hadičku ponořte do dalšího vzorku.
 16. V nastavení parametrů (**S**) v záložce **Vzorky** pomocí tlačítka **Upravit** aktivujte další vzorek, který chcete měřit a spusťte **Start** (!). Ve spouštěcím okně vyberte **Krok 2** a spusťte **Start**.
 17. Postupem popsáním v bodech 13-16 změřte všechny vzorky. Po změření každého vzorku soubor vždy uložte!

Ukončení měření

- Všechny hadičky ponořte do nádoby s destilovanou vodou a aktivujte okénko **Pump**. Propláchněte systém postupným přepínáním okének **Elektrolyt**, **Vzorek** a **Standard**. Každé okno nechejte aktivní minimálně 2 minuty. Promývání ukončete deaktivací tlačítka **Pump**.
- Uvolněte přítlačné ramínko peristaltického čerpadla a odpojte výtokovou (horní) hadičku cely.
- Vypněte přístroj a počítač.

Vyhodnocení

Z průměrných hodnot výsledků a směrodatných odchylek vypočítejte obsah askorbové kyseliny ve vzorcích a vyjádřete ho v **mg/l** kontrolního vzorku, **mg/100 ml** ochucené stolní vody a **mg/100 g** čerstvého rostlinného materiálu resp. **mg/100 g** sušiny. Obsah vitamínu C stanovený v ochucené stolní vodě porovnejte s hodnotou uvedenou výrobcem, obsah v rostlinném materiálu srovnajte s běžnými hodnotami uváděnými v dostupné literatuře.